

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-294622

(43)Date of publication of application : 22.12.1987

(51)Int.Cl.

A61K 37/64
// A61K 35/78

(21)Application number : 61-020362

(71)Applicant : MAEDA HIROSHI
FUJI OIL CO LTD

(22)Date of filing : 31.01.1986

(72)Inventor : MAEDA HIROSHI
MATSUMURA YASUHIRO
TAKAMATSU SEIJI
SHIMODA TADAHISA

(54) CANCEROUS BREAST-ASCITES RETENTION SUPPRESSIVE AGENT, INFLAMMATORY EDEMA STHNIA SUPPRESSIVE AGENT AND ENHANCER FOR CARCINOSTATIC ACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: The titled suppressive agent comprising a soybean Kunitz type trypsin inhibitor or a derivative thereof as an active ingredient.

CONSTITUTION: A cancerous breast ascites retention suppressive agent and inflammatory edema sthnia suppressive agent containing a soybean Kunitz type trypsin inhibitor (KTI; having about 20,000 molecular weight) or a derivative thereof as an active ingredient. An enhancer for carcinostatic action containing the compound as an active ingredient. The soybean derived KTI is obtained by extracting soybeans, de-fatted soybeans, soybean whey, etc., as a raw material with an aqueous medium of a polar organic solvent (e.g. ethanol, acetone, etc.), concentrating through membrane separation, isoelectric point precipitation, salting-out etc., and fractionating to give coarsely purified substance and further purifying the substance. The substance and a derivative thereof can be administered to breast or abdominal cavity locally, intravenously, through artery, through mucosa, percutaneously or orally. The substance or the derivative thereof are effective for selective action on the affected part and produces no side effects to destroy normal tissue.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭62-294622

⑪ Int. Cl. 1
 A 61 K 37/64 識別記号 厅内整理番号 ⑬ 公開 昭和62年(1987)12月22日
 // A 61 K 35/78 A B F 8615-4C
 A D S 8413-4C
 審査請求 未請求 発明の数 2 (全 7 頁)

⑤ 発明の名称 癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用
 増強剤

⑪ 特願 昭61-20362
 ⑫ 出願 昭61(1986)1月31日

⑬ 発明者 前田 浩 熊本市保田窪本町631-3
 ⑭ 発明者 松村 保広 熊本市世安町212 世安団地4-806
 ⑮ 発明者 高松 清治 大阪市大正区鶴町1-13-10
 ⑯ 発明者 下田 忠久 泉南市新家1315-30
 ⑰ 出願人 前田 浩 熊本市保田窪本町631-3
 ⑱ 出願人 不二製油株式会社 大阪市南区八幡町6番1
 ⑲ 代理人 弁理士 門脇 清

明 余田

1. 発明の名称

癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤

2. 特許請求の範囲

(1) 大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とすることを特徴とする癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤
 (2) 大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とすることを特徴とする制癌作用増強剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤に関するものである。

(従来の技術)

従来から植物由来のプロテアーゼインヒビターが種々報告されている。これらインヒビターには

特異性があり、例えば、トウモロコシトリプシンインヒビター やカボチャトリプシンインヒビターは、トリプシンと活性型ハーゲマン因子に抑制活性を示し (Thromb. Res. 20, 149, 1980 等) 、ダイズトリプシンインヒビターのうちクニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターは、トリプシン、血漿カリクレイン、活性型第X因子等に抑制効果を有することが知られている。また炎症性浮腫亢進の際には、プラジキニンの活性が発現し、疼痛や血管透過性が増大するが、プラジキニンの活性発現にはハーゲマン因子やカリクレインが関与するスキームが提案されている。

しかし、プロテアーゼインヒビターと炎症の関係は、in vitroでの研究の段階にとどまっているのが現状で、in vivoでの効果を実証した報告例は極めて少ない。

一方、胃癌、腎癌、卵巣癌、肝癌等の患者には腹水が、肺癌の患者の場合には胸水が、更に貯留し、これら因性腫瘍の術後播種によって高い確率で腹腔或いは胸腔内に腫瘍が転移し、その結果同

様の貯留が認められる。腹水の貯留が生じると、血漿タンパクの低下を来し、患者の体力低下その他の増悪を来すので、治療効果の低下、多量輸血漿の必要性が生じ又、胸水の貯留が生じると呼吸不全をもたらし、ひいては患者の悪疾質の導入を速める等、癌の治療上重大な結果をもたらす。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者は、炎症抑制とプロテアーゼインヒビターの関連について種々検討した結果、大豆クニツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビター、とりわけその誘導体が、*in vivo* において炎症性浮腫の抑制に著しい効果があることを見出した。また、炎症における血管透過性増大と固形腫瘍における血管透過性増大の機構が類似していること（固形腫瘍及び炎症部位における血管透過性亢進と血漿成分の漏出が類似）に着目して種々検討する中で、該インヒビター及びその誘導体が癌性胸・腹水貯留抑制にも効果を有すること、即ち、該インヒビターが癌組織における血管透過性を強く阻害し、腹水癌 (Meth A, Sarcoma 180) の系に於いて上

記阻害物質の連続投与によって、腹水の貯留を頭著に抑えて、癌マウスに延命効果をもたらすこと等を見いだし、癌治療上にも有益な薬剤になるとの知見を得、この発明を完成したものである。

(問題点を解決するための手段)

即ち、この発明は、一つは、大豆クニツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とする癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤であり、他の一つは、大豆クニツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とする制癌作用増強剤である。

大豆トリプシンインヒビターは、分子量約 2 万のクニツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターと分子量約 6 千～8 千のボウマンーバーク (Bowman-Birk) 型トリプシンインヒビターに二大別される。それらの基本的性質は *Methods in Enzymology* 19, 853 (1970)、及び、「タン白質研究の新しい視点 (化学的研究を中心として)」第 1738 頁

(1982) (共立出版) 等によって明らかにされており、その内代表的なクニツ (Kunitz) ドリップシンインヒビターやボウマンーバーク (Bowman-Birk) インヒビターの構造は既に決定されており (*Eur. J. Biochem.*, 32, 417 (1973)、*J. Biochem.*, 74, 697 (1973))、従って、それらの化学的、生物学的方法 (細胞培養、遺伝子組替等) による合成も今日可能である。

この発明の剤は、大豆クニツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビター (以下 KTI という) を活性成分とするが、KTI は大豆由来のもの、及びこれを限定分解して尚 KTI 固有の活性を保持するもの、並びにこれらを上記化学的、生物学的方法により合成して得たものを包含する。

大豆由来の KTI の調製方法は、すでにいくつかの具体的方法が提案されていて、いずれの方法を採用してもよいが、一般的には大豆、脱脂大豆、大豆ホエーなどを原料にし、これらから、水性媒体または極性有機溶剤 (例えばエタノール、アセトンなど) による抽出、膜分離、等電点沈殿、塩

析等による濃縮、分画によって粗精製物を得、これをさらに、ゲル通過、イオン交換、物理的若しくは化学的吸着手段などによりさらに精製された標品を得ることができ、その活性や純度も、公知の方法例えは、クニツ (Kunitz) のカゼイン消化法 (本明細書での表記は、この方法で測定し、Sigma 社製トリプシン「タイプ-XI」 (7500～9000 BAEE Unit/mg の活性蛋白) 1 mg を阻害する量を 1 Unit とした) や SDS 含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等により測定することができる。

活性成分としての量は、精製度、投与方法、残存活性により多少相違するが、1.5～2.5 Unit/mg の活性を有する KTI 蛋白質重量に換算して、概ね腹腔内投与の場合 1～3000 mg / 60 kg 体重の範囲、静脈注射の場合 1～300 mg / 60 kg 体重の範囲を目標として定めた含量が適当である。

誘導体は、蛋白質である KTI の抗原性を低下させ、また分解物質 (SH-プロテアーゼなど) に対する安定性を増し (生体内半減期の改善)、或いは疎水性を賦与することにより両親媒性を増すと

いった一または二以上の目的のために使用することができる。このような誘導体は、KTI と、種々の修飾体、例えばスチレンマレイン酸無水物共重合体 (SMA) 及びその部分エステル化物、ポリエチレングライコール、ビニールエーテル共重合体、ビラン、西独公開特許第315541号に例示のもの等、との結合物、その他低分子の修飾体との結合物等が挙げられ、これらとの結合方法は既知に属するが、上記一または二以上の目的が達成されるものであればどのような方法によってもよい。例えば修飾体がSMA またはその部分エステル化物の場合は、KTI のN-末端アミノ基乃至リジン残基のε-アミノ基に対して中性乃至アルカリ性溶液中で直接反応させ、ペプチド結合を形成する方法が本発明者である前田らにより報告されている (Journal of Medicinal Chemistry, 28, 455-461, (1985)).

本物質及びその誘導体は、局所的、経静脈的、経動脈的、経粘膜的、経皮的、経口的な投与及び腹腔内投与することが可能である。

くは単味体を各々個別に投与する方法があげられる。

〔作用〕

KTI は炎症性浮腫亢進抑制効果、及び癌性腹水、胸水貯留抑制効果を有し、結果として、延命効果を示す。KTI は、さらに、自体制癌作用を有する剤と併用することにより、該剤の有する抗癌作用を増強する。これらの効果の生じる理由は完全には明らかでないが、炎症性浮腫の場合に関与すると考えられるカリクレインープラジキニン系をin vivoにおいてKTI が効果的に阻止し、プラジキニンの発現による疼痛発生と血管透過性の亢進を抑制すること、及び、癌組織の血管透過性増大に同様の系が存在して血管透過性を抑制、即ち、該組織への血漿蛋白質などの漏出が抑制され胸水、腹水の貯留を抑制すること、並びに、該組織への血漿成分一栄養供給が遮断され、抗癌剤の直接の作用力を高めるのではないかと推定される。又アロテアーゼによる癌細胞増殖促進作用を一部には抑制している可能性がある。さらに、KTI の分子

即ち、例えば静脈注射用の水溶性薬剤として、KTI そのまま、又は生理食塩水、5%グルコース溶液、若しくはその他の水溶性注射剤に溶解しての使用をすることができる、動脈注射用の油剤としてリビオドール化した製剤としても使用することができ、その他、KTI を溶解した水溶液を乳化剤を用いオリーブ油、中鎖脂肪酸エステル、リノール酸エステル、大豆油、桐油等の油脂と乳化しての使用、リポゾームの形態での使用も可能である。

KTI またはその誘導体は、自体制癌作用を有する剤と併用することが出来る。

自体制癌作用を有する剤としては、ネオカルチノスタチン (NCS)、スマンクス (SMANCS: スチレンマレイン酸 (SMA) 共重合体と、ネオカルチノスタチン (NCS) のアミノ基を介して結合させたもの)、マイトイマイシン (商品名) 等の抗癌性抗生物質、5-Fu (商品名) 等の代謝拮抗剤、ビシバニール (商品名) 等の免疫賦活剤、又はその他の抗癌性薬剤を使用することができ、KTI との併用の態様としては、一製剤に加工して、若し

量は約2万 (誘導体はこれ以上) であるため、血管透過性の亢進していない正常組織への漏出は殆どなく、ある程度血管透過性の亢進した組織への選択性透過・作用に寄与し、浮腫や癌組織の成長を抑制することも推定される。また、炎症局所の浸出液 (漏出液) はリンパから回収されるが、腫瘍組織においてはリンパ系がないので浸出した高分子は回収されずに長期間そこに留まると考えられ、この性質も患部への選択性作用に有用であると考えられる。

尚、癌組織への栄養供給の遮断は、物理的塞栓法による栄養供給抑制の考え方と類似するが、物理的塞栓は屢々正常な組織までも壊す弊害があるので比べ、本発明剤ではこのような副作用は生じない。

〔実施例〕

以下この発明を実施例で説明するが、例示は説明用のものであって発明精神の限定を意図したものではない。

実施例1 (KTI の調製例)

低変性脱脂大豆から分離大豆蛋白を製造する過程で得られる大豆ホエーを濃縮し、この濃縮物（粗蛋白質含量 5.5%）1容に対し0.5容のアセトンを加えて約1時間攪拌し、遠心分離により得られた上清に対し、さらに1.5容のアセトンを加えて約1時間攪拌し、遠心分離して得られた沈殿画分を、水に対して透析した。この透析液に1/50量の0.5M-炭酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を加え、pHを7.0に調節し、DEAE-セルロースイオン交換カラムに通して、該樹脂に吸着させ、次いで0~0.4Mの直線食塩濃度勾配を有する溶出液を、フラクションコレクターにより分画し、BBI型トリプシンインヒビター又はKTIに富む画分をさらに各々塩析濃縮し、（さらにBBI型トリプシンインヒビターについてはCMセルロースイオン交換樹脂でさらに精製し）、各濃縮精製物を等電点沈殿後、凍結乾燥してKTI標品及びBBI型トリプシンインヒビター標品を得た。各標品の純度は、SDS含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、蛋白質中95%以上であった。又、比活性は前者が1.97 U

nit/mg蛋白、後者が3.37 Unit/mg蛋白であった。

実施例2（腹水貯留抑制及び延命効果）

生後8週目の♀のddY-マウス（1群7匹）の腹腔内にSarcoma 180懸濁液を50万cell/匹になるよう移植し、その日から生理食塩水1ccに対して上記調製例で得たKTI若しくはBBI型トリプシンインヒビターを3mg溶解した水溶性薬剤又は溶解しない生理食塩水を1日、1匹あたり1ccづつ4日又は14日連続して腹腔内に投与し、その間自由摂食・自由摂水させた。Sarcoma 180を全く移植しない無処置群も並行して実施した。

この間の体重測定を行った結果を第1図（14日間投与）及び第2図（4日間投与）に示した。両図に示された結果及び肉眼的観察により、KTIによる体重増加の抑制効果（腹水貯留の抑制効果）が明らかに認められ、無処置群との差異が殆ど無かったのに対して、BBI型トリプシンインヒビターによる該抑制効果は殆ど認められなかった。

さらに上記投与例での平均生存日数等は次表の

通りで、延命効果が認められた。

表-1

投与日数	14日		4日
	平均生存日数	20日目の生存率(%)	
コントロール	19.1日	28.6	21.4日
KTI	26.0日	100.0	24.8日
BBI型	21.9日	71.4	21.0日

実施例3（部分ブチル化SMAと結合した誘導体の調製例）

実施例1の方法で調製したKTI 300mgを、30ccの0.5M炭酸水素ナトリウム液に溶解し、部分ブチル化SMA（平均分子量約2000）を150mg加えて25℃で90分間攪拌した後、グリシン溶液を加えて反応を停止した。このものの残存活性は36.3%であり、TNBS法（蛋白質、核酸、酵素、18(13), 1153-1159, (1973)）にて測定した修飾されたアミノ基の個数は1.94個/分子であった。さらに炭酸水素アンモニウム溶液に透析し、凍結乾燥してKTIのSMAで修飾された誘導体（KTI-SMA）を得

た。

実施例4（炎症性浮腫昂進抑制効果）

実施例3で得た修飾したKTI-SMAを生理食塩水に溶解したものを被験薬とし、該被験薬又は生理食塩水と混合して調製した1%カラゲニン溶液（KTI-SMAの含量は各々5mg/cc、又は15mg/cc）をSD系ラット（平均体重150g±5g、1群5匹）に対して、0.1cc/部位投与して炎症を惹起し、経時的に足容積を測定することにより、カラゲニン誘発足浮腫に対する抑制効果を調べた結果は第3図の通りであった。

同図に示されるように、炎症惹起後3時間の時点において、KTI-SMA 15mg/cc投与群に顕著な炎症性足浮腫抑制効果が認められた。

尚、KTI-SMAにかえて実施例1で得た無修飾のKTI 20mg/CC使用したものの抑制効果はKTI-SMA 5mg/cc投与群と同程度の効果にとどまった。

実施例5（制癌剤増強作用の効果）

生後8週目の♀のddY-マウス（1群10匹）の腹腔内にSarcoma 180懸濁液を50万cell/匹

になるよう移植し、その日から生理食塩水に対して前記調製例で得たKTI、ネオカルチノスクチン(NCS)又は両者の混合物を1日、1回7日間連続投与し、生理食塩水のみを投与した群をコントロールとした。実験期間中は自由摂食・自由摂水させた。

投与量及び、生存率(%)の推移を次表に示した。

表-2

群	投与量 mg/kg 体重	生存率(%)		
		20日	30日	50日
コントロール	—	100	0	0
KTI	100 (a)	100	30	0
NCS	0.01 (b)	100	30	0
KTI+NCS	(a) + (b)	100	60	40

上表の結果が示すように、KTIは自ら延命効果を有するのみならず、制癌剤(NCS)の効果を高める相乗作用を有することが認められた。

〔効果〕

以上説明したように、KTI及びその誘導体を有効成分とする剤は、炎症性浮腫の抑制及び癌性胸

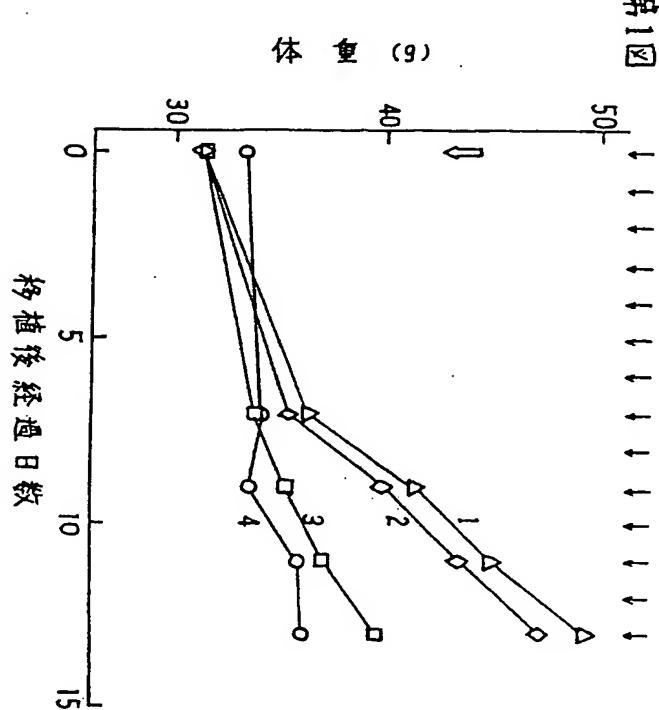
水腫水の貯留抑制効果並びに制癌作用増強効果を有する。炎症性浮腫の抑制は浮腫による疼痛の発生または亢進を未然に抑制し、胸水腹水の貯留抑制により、該貯留による弊害例えは、患者の体力低下、治療効果の低下、多量の輸血漿、呼吸不全、悪疫質の導入等を未然に防止乃至抑制し、治療効果を高める等、延命させる効果がある。

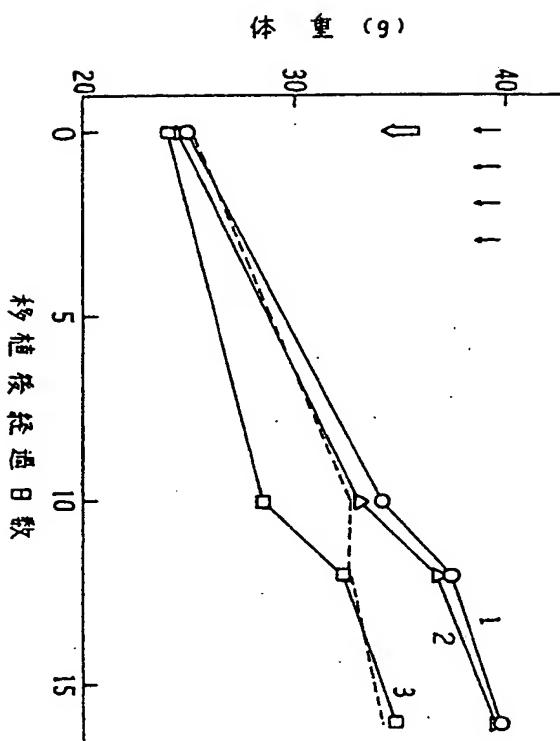
4. 図面の簡単な説明

第1及び2図は、実施例2における投与薬剤と体重増加(=腹水貯留量)の関係を示すグラフである。第1図中(1) (△) 生理食塩水投与群、(2) (◇) BBI トリプシンインヒビター投与群、(3) (□) KTI 投与群、(4) (○) 無処置群。(↓) 癌細胞移植日、(↓) 薬剤投与日。第2図中(1) (○) 生理食塩水投与群、(2) (△) BBI トリプシンインヒビター投与群、(3) (□) KTI 投与群、(折線) 無処置群。(↓) 癌細胞移植日、(↓) 薬剤投与日。第3図は実施例4における足浮腫の容積変化を示すグラフである。同図中(1) (○) 生理食塩

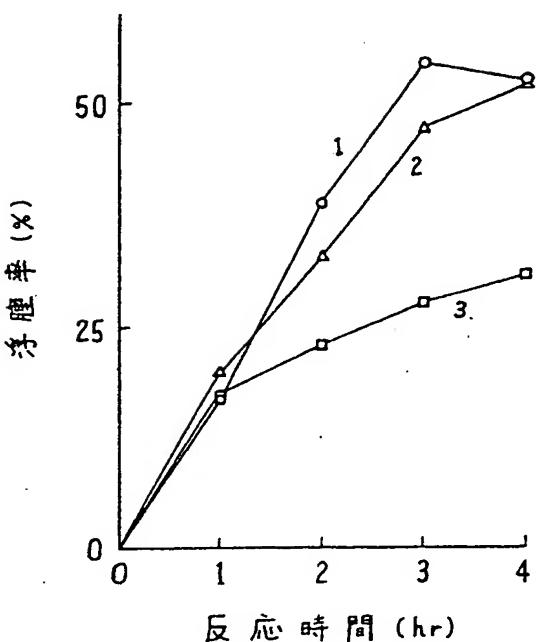
水投与群、(2) (△) KTI-SMA 5mg/cc投与群、
(3) (□) KTI-SMA 15mg/cc投与群 KTI投与群

特許出願人 前田 浩
不二製油株式会社
代理人弁理士 門脇 清





第3図



手続補正書(自発)
昭和61年2月13日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示 61-020362

昭和61年1月31日出願の特許願

2. 発明の名称

癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 熊本県熊本市保田窪本町631-3

氏名 前田 浩

住所 大阪市南区八幡町6番1

名称 不二製油株式会社

代表者 久本 浩一郎

4. 代理人

大阪市淀川区東三国1丁目32番12号

リビース新御堂606号

(6294)弁理士 門脇

電話 06-395-2714

5. 補正により増加する発明の数 0

6. 補正の対象

委任状並びに明細書の発明の詳細な説明及び図面の簡単な説明の図

7. 補正の内容

- (1) 委任状を別紙のとおり差し出します。
- (2) 明細書第2頁第19行に「し、これら」とあるを「し、またこれら」と訂正する。
- (3) 明細書第16頁第11行「生理食塩水投与群」の次に「(Sarcoma 180 担癌対照)」を加入する。
- (4) 明細書第16頁第13行「無処置群」の次に「(非癌対照)」を加入する。
- (5) 明細書第16頁第15行「生理食塩水投与群」の次に「(Sarcoma 180 担癌対照)」を加入する。
- (6) 明細書第16頁第17行「無処置群」の次に「(非癌対照)」を加入する。

手続補正書(方式)

昭和62年7月8日

特許庁長官 小川邦夫殿

1. 事件の表示

特願昭61-20362号

2. 発明の名称

癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪市南区八幡町6番1

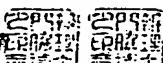
名称 不二製油株式会社

代表者 久本浩一郎

4. 代理人 532

大阪市淀川区東三国1丁目32番12号

リビース新御堂606号

(6294)弁理士 門脇 
電 06-395-2714

5. 補正命令の日付 昭和62年6月3日

(発送日 昭和62年6月30日)

6. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄

8. 補正の内容

別紙の通り(明細書の発明の名称の欄を正確に記載した明細書第1頁を添付します)

特許局

明細書

1. 発明の名称

癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤

2. 特許請求の範囲

- (1) 大豆クニッツ(Kunitz)型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とすることを特徴とする癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤。
- (2) 大豆クニッツ(Kunitz)型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とすることを特徴とする制癌作用増強剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤並びに制癌作用増強剤に関するものである。

(従来の技術)

従来から植物由来のプロテアーゼインヒビターが種々報告されている。これらインヒビターには